

[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl<sup>6</sup>



[12] 发明专利申请公开说明书

C12N 15/79  
C12N 15/67 C12N 1/00  
C12P 21/02 C07K 14/505

[21] 申请号 98100248.X

[43]公开日 1998年8月12日

[11] 公开号 CN 1190130A

[22]申请日 98.1.19  
[71]申请人 沈阳三生制药股份有限公司  
地址 110141辽宁省沈阳市经济技术开发区十号  
路1甲3高军  
[72]发明人 姜丹 徐莉萍 邹钟诚

权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 重组人红细胞生成素制剂的制备生产方法

[57]摘要

本发明公开了一种大规模生产人红细胞生成素的制剂方法。该方法包括用添加了胰岛素和转铁蛋白的营养培养基,于特定培养条件下培养携带人促红细胞生成素 DNA 编码序列的被转化的哺乳动物细胞,以获得该蛋白质产物的高表达。然后对富含人红细胞生成素的收获液依次进行亲和层析、离子交换、反相高效液相及凝胶过滤纯化,以获得纯度高并具有高生物活性的人红细胞生成素。

(BJ)第 1456 号

## 权 利 要 求 书

---

1. 本发明的目的是提供一种在工业化生产规模上提高携带编码人促红细胞生成素或其突变蛋白之基因的真核宿主细胞的表达效率的方法, 该方法包括在转化体细胞的营养培养基中加入适当量胰岛素、转铁蛋白、糖及碳酸氢钠。

2. 根据权利要求1的方法, 其中所说的营养培养基是DMEM培养基, 且其中添加的胰岛素量为 $1\text{nM} - 10\text{nM}$ , 转铁蛋白加入量  $0.1\text{nM} - 100\text{nM}$ , 微量元素硒加入量为 $1 - 1,000\text{ppm}$ , 葡萄糖加入量为 $1 - 10\text{克/升}$ , 碳酸氢钠加入量为 $2 - 4\text{克/升}$ 。

3. 根据权利要求1的方法, 一种在工业化生产规模上纯化由携带编码人促红细胞生成素基因或其突变蛋白基因的真核宿主细胞产生的蛋白质的方法, 该方法包括将终发酵液依次过亲和层析柱、离子交换层析柱、反相高效液相层析柱和凝胶过滤层析柱。根据本发明这一目的的一个优选实施方案, 其中在亲和层析步骤中使用含 $0 - 2\text{M}$  NaCl梯度的 $20\text{mM}$  Tris.HCl缓冲液进行梯度洗脱, 以使该层析步骤后所得产物的浓度达到约 $8 - 12\%$  (W/W)。

4. 根据权利要求3的方法, 其中在离子交换层析步骤中, 使用含 $0 - 1\text{M}$  NaCl梯度的Tris.HCl缓冲液进行梯度洗脱, 以使该层析步骤后所得产物的浓度达到约 $40 - 50\%$  (W/W)。

5. 根据权利要求3的方法, 其中反相高效液相层析步骤中使用含 $10 - 70$  (V/V) 乙腈的三蒸水梯度洗脱液进行梯度洗脱, 以使该层析步骤后所得产物的浓度达到 $95\%$  (W/W) 以上。

6. 根据权利要求3的方法, 其中凝胶过滤层析步骤中使用 $10 - 40\text{mM}$ 柠檬酸盐缓冲液进行平衡和洗脱, 以使该层析步骤后所得EPO产物的纯度达到 $100\%$  (W/W)。

## 说明书

### 重组人红细胞生成素制剂的制备生产方法

本发明涉及利用携带编码人促红细胞生成素蛋白质的核苷酸序列的真核细胞表达系统，大规模生产人促红细胞生成素蛋白质的方法。特别是涉及以高产率为目的的分离和纯化高比活性人促红细胞生成素的方法。

人促红细胞生成素（hEPO）是一种主要由肾脏产生的分子量约36KD的糖蛋白。该蛋白质作为一种正常激素，可有效地作用于骨髓干细胞，调节和刺激网织红细胞及红细胞的生成与分化，从而维持外周循环内的正常红细胞数量。因此临床上可用于治疗各种形式的贫血，特别是肾性贫血和因该激素产生不足而引起的红细胞缺乏症。

美国专利申请序号 NO. 570, 075 (New York University) 和美国专利NO. 4, 677, 195 (Genetics Institute, Inc.) 分别公开了以反相免疫层析法从天然来源纯化人促红细胞生成素的方法，后者以反相高效液相层析法制备的红细胞生成素蛋白质比活性为 160, 000 IU/280 nm吸光率单位。中国专利CN 85106191A (柯瑞英-艾格公司) 公开了利用真核细胞和原核细胞表达系统生产具有天然人促红细胞生成活性的蛋白质（人促红细胞生成素）的方法。其中以反相高效液相法得到的以大肠杆菌表达的hEPO产物体内活性只有120-720IU/mg蛋白质，特别是该文献中提到，发明人用真核细胞表达系统（中国仓鼠卵巢细胞）获得EPO产物体外和体内活性分别为2589IU/ml和3089 IU/ml。另外，其表达产物的纯度约95%，而且明确缺乏足够的分子均一性。至于其所制备的人促红细胞生成素类似物的活性只是其“亲代”的 1/4 - 1/10。欧洲专利申请0232 034公开使用宿主细胞（Hela细胞）作宿主发酵生产rhEPO的方法，其中提到了产物活性为490单位。PCT 专利公开号 W088/00241，公开使用COS-7（猴肾）和BHK（仓鼠肾）细胞表达系统表达人促红细胞生成素基因的Apa I 限制性片段的方法，虽然该文献没有描述表达产物的分离和纯化方法，但其实施例7 中指出的分泌产物的比活为700单位/ml，估计有相当于天然EPO的7800 单

位/ml蛋白质的比活性。最后，欧洲专利申请 0236 059公开了使用带有neo<sup>r</sup>选择标记基因的重组载体（线性转导载体）在哺乳动物细胞内表达，并以亲和层析法纯化 EPO的方法，经体外放射免疫法检测证明促红细胞生成素蛋白质的产量为100-1500单位/10<sup>6</sup>细胞/天。

综上所述，这些现有材料仅就实验室水平表达产物的分离与纯化手段而言，均不能获得令人满意的效果。特别是由实验室研究到工业化规模大批量生产过程，技术上存在本质性的差异，不经过长时期的创造性探索和大量的实验积累，尽管在实验室内成功地得到了所需产物，但要以高收率、低成本获得高比活性的基因工程产品，如人促红细胞生成素，真正实现目的产物的商品化并获取应有的利益将是不可能的。

迄今为止，已建立并在生产实践中成功地使用了许多从天然来源或从以DNA重组技术制备的转化体细胞及其培养物中分离和纯化所需的目的产物的方法，这些方法包括盐析、超滤、电泳（如聚丙烯酰胺凝胶电泳、等电聚焦、毛细电泳等）、柱层析（如离子交换层析、凝胶层析、高效液相层析、亲和层析等）。由于所需产物分子量大小、带电性和分子电荷数目、亲水性及等电点的不同，改变在分离和纯化产物时所需的方法或方法组合及它们的次序也将完全不同。因此在找到一套适合工业化生产规模使用的对重组菌株或细胞株的发酵培养条件，以提高产物表达效率，并且改进分离和纯化DNA重组产物，例如目前已在临床应用中证实其效果十分明确的重组人促红细胞生成素（rhEPO）的方法，是一个本领域有待解决的问题。

本发明通过采用本实验室构建的携带编码人促红细胞生成素蛋白质的核苷酸序列的真核细胞（CHO细胞）表达系统，利用特定的培养基和培养条件及连续柱层析方法来实现的。其技术方案要点包括以下步骤：

取冻存的生产细胞株，39℃水浴，在无菌操作下离心。弃上清后加入适量的含10%胎牛血清的DMEM培养基，并接种于细胞培养瓶中，在二氧化碳孵箱中37℃培养。待细胞生长良好并贴满培养瓶壁后，继续传代（传三代）培养。用显微镜观察细胞的状态，在细胞呈梭形，生长状态良好时，弃去旧培养基，用消化液将细胞消化，收集于接种

瓶中。用于接种的细胞数量为  $2.5 \times 10^6$  个/ml。

含人红细胞生成素基因的重组细胞株的表达采用容积为5L的连续型细胞反应器（以下简称细胞罐），加入纤维素载体片（Disc）、PBS缓冲液（pH7.0），连好管路，高压灭菌1.5小时。待细胞罐冷却至室温后接入主机，并连接空气、氧气、二氧化碳、氮气等四种气体。校正好 pH电极和DO<sub>2</sub> 电极后，排出细胞罐内的PBS缓冲液，加入含 10 % 胎牛血清的DMEM培养基，再将细胞接种液缓慢加入细胞罐中，调节搅拌转数低于50 rpm/分钟，温度为37℃，通入四种气体，控制DO<sub>2</sub> 50 -80 %， pH7.0，进行贴壁培养一段时间。然后提高转数到 80 -100rpm/min，进行细胞罐内扩增培养十天。（有血清培养基可有效刺激细胞的分化和增殖）。将含胎牛血清的 DMEM 培养基更换为无血清的合成培养基，用连续灌注培养基的培养方法，应用AFS 软件控制细胞的发酵条件，包括温度、溶氧、pH值等。收获的培养基于4-8℃低温贮藏。本生产条件下收获的培养基中hEPO的表达产量可达到1 万 IU/ml。同时应用无血清的合成培养基可降低纯化过程中杂蛋白质的含量，增加各层析色谱柱的容量，延长其使用寿命，有效提高半成品的纯度。）

取收获的培养基滤膜过滤，然后以一定的流速上CM亲和层析柱（预先用NaCl-HAc-异丙醇活化，20mM Tris.HCl平衡缓冲液平衡），再用平衡缓冲液平衡CM柱。采用0-2M NaCl-20mM Tris 洗脱液以一定流速进行梯度洗脱，收集有活性的洗脱峰装入透析袋，在10mM Tris 透析液中过夜透析。将已透析除盐的蛋白质溶液滤膜过滤，以一定的流速上DEAE离子交换层析柱（预先用10mM Tris平衡缓冲液平衡）。采用0-1M NaCl-Tris的洗脱液进行梯度洗脱，收集有活性的洗脱峰，上RP-HPLC（RP-HPLC层析柱填料为C<sub>4</sub>，预先用乙腈-三氟乙酸平衡）层析柱，然后用10%的乙腈溶液平衡该层析柱，再用10-70 %的乙腈溶液进行梯度洗脱。收集有活性的洗脱峰，上凝胶层析柱（预先用20mM柠檬酸盐缓冲液平衡），再用20mM柠檬酸盐缓冲液平衡并洗脱，收集有活性的洗脱峰（即hEPO）。取样测定hEPO的比活、蛋白含量，经质检合格后将hEPO中加入0.5 %的人血白蛋白，无菌过滤后制成hEPO成品制剂。经本工艺纯化的rh-EPO，其比活可达到  $2 \times 10^6$  IU/mg。

下面借助实施例进一步举例描述本发明，但这些实施例并不以任何方式限制本发明。

#### 实施例一：细胞的增殖

取冻存细胞株，39℃水浴，无菌操作下离心(1000rpm×5分钟)。弃上清后加入5ml含10%胎牛血清的DMEM培养基(每10L含DMEM 135克，胎牛血清 500 ml，庆大霉素 50万单位，葡萄糖 13.5 克，碳酸氢钠 24.5克)吹打均匀，接种于100ml细胞培养瓶中，再加10ml含10%胎牛血清的DMEM培养基，于37℃、含5% CO<sub>2</sub>的二氧化碳孵箱(Forma公司生产)中培养。待细胞生长状态良好，贴满培养瓶壁后，传入四个500ml培养瓶中，并在细胞再次贴满瓶壁时，传入32瓶500ml的培养瓶。用显微镜观察细胞生长状态，当细胞处于对数生长期时，弃去旧培养基，用消化液(每升含有EDTA 0.2g，葡萄糖 1g，胰酶 2g，pH7.6)将细胞消化，收集于接种瓶中。用于接种的细胞数量为 $2.5 \times 10^6$ 个/ml，共900ml。

#### 实施例二：人红细胞生成素的表达

细胞罐采用容积为5L的连续型细胞反应器(CELLIGEN PLUS, NBS公司制造)，加入150克纤维素载体片(Disc, LifeGen Co.生产)、3.5L的PBS缓冲液(pH7.0)，连好管路，在121℃、15磅下高压灭菌1.5小时。待细胞罐冷却至室温后接入主机，连接空气、氧气、二氧化碳和氮气等四种气体，校正好pH电极和DO<sub>2</sub>电极。排出细胞罐内的PBS缓冲液，加入2500ml含10%胎牛血清的DMEM培养基，再将900ml细胞接种液缓慢加入细胞罐中，调节转数为50 rpm/分钟，通入四种气体(氧气、氮气、二氧化碳气和压缩空气)，控制DO<sub>2</sub> 50%，pH7.0，使细胞贴壁生长四小时。然后提高转数到80rpm/分钟，继续扩增培养十天。将培养基更换成无血清的合成培养基(每10L含CHO-S-SFM-II 9 L，庆大霉素 50万单位，胰岛素 1mM，转铁蛋白 20nM，葡萄糖 25克，碳酸氢钠 30.5克)，用连续灌流培养基的培养方法，应用AFS软件(NBS公司设计生产)控制细胞发酵条件(温度37℃、DO<sub>2</sub> 40-80%、pH 6.5-7.5，培养基灌流量为3L/天)，收获液于4-8℃低温下贮藏。

### 实施例三：hEPO的纯化

取收获培养基40L，用0.22 $\mu$ m滤膜过滤，上样于体积为2500ml的预先用1.4M NaCl-40%异丙醇-0.1MHAc 13000ml (pH3.0) 活化，用10000ml三蒸水冲洗，最后用20mM Tris (pH7.0) 10000ml平衡缓冲液平衡的CM Affi-Gel Blue Gel柱 (BioRad公司生产)，上样流速为30ml/min 上样完毕，再用平衡缓冲液平衡柱体，洗掉不能吸附的杂蛋白。采用0-2M NaCl-20mM Tris (pH7.0) 洗脱液进行梯度洗脱吸附的蛋白质，洗脱流速40ml/min。收集洗脱峰 3000ml，蛋白含量为1mg/ml。将收集的蛋白溶液装入透析袋，用10mM Tris.HCl (pH7.0) 透析液过夜透析，按15倍体积计算，分四次换液。

将已透析除盐的蛋白质溶液用 0.22 $\mu$ m滤膜过滤，上样于体积为2500ml的预先用10mM Tris.HCl (pH7.0) 50000ml 平衡缓冲液平衡的DEAE-Sephacrose Fast Flow柱 (Pharmacia 公司生产)，上样流速为4ml/分钟。上样完毕，采用0-1M NaCl-Tris.HCl (pH7) 的洗脱液进行梯度洗脱，洗脱流速为40ml/min。收集第三个洗脱峰1800ml，蛋白含量为0.37mg/ml，经无菌过滤后制成含hEPO的粗品准备用于RP-HPLC的进一步纯化。

柱填料为C4 (300A<sup>+</sup>、15 $\mu$ m, Separation Group生产)，柱体积为500ml的RP-HPLC (Waters 公司生产，2000型) 层析柱用10%的乙腈溶液 (含0.1%三氟乙酸) 平衡，流速为60ml/min。取1800ml 粗品上样，流速为15ml/min；上样结束后用10%的乙腈溶液 (含0.1%三氟乙酸) 平衡C4柱。再用10-70%的乙腈溶液进行梯度洗脱。收集有活性的洗脱峰330ml，蛋白含量为1.0mg/ml。

凝胶过滤采用的是Sephadex G-25 柱 (Pharmacia公司生产)，装柱体积3000ml，用20mM柠檬酸盐缓冲液6000ml平衡，取RP-HPLC 纯化后的样品上样，流速为1ml/min。上样完毕，再用20mM 柠檬酸盐缓冲液平衡并洗脱，收集洗脱峰250ml，蛋白含量为1.2 mg/ml。取样用酶标仪 (Bio-Rad公司，3550型) 测定半成品中hEPO的比活，用紫外分光光度计 (BECKMAN公司生产，DU-640型) 测定蛋白质浓度；经质检合格后，加入0.5%的人血白蛋白并无菌过滤，制成hEPO成品。经本生产工艺流程纯化的hEPO，其比活可达到 $2 \times 10^6$  IU/mg。